

XP-002278838

AN - 1995-348317 [45]

AP - JP19940030034 19940228

CPY - KYOW

DC - B04

FS - CPI

IC - A61K38/46

MC - B04-C01 B14-J01A4

M1 - [01] M423 M720 M903 N161 N470 N512 P446 V802 V814

PA - (KYOW) KYOWA HAKKO KOGYO KK

PN - JP7238035 A 19950912 DW199545 A61K38/46 004pp

PR - JP19940030034 19940228

XA - C1995-152872

XIC - A61K-038/46

AB - J07238035 Beta amyloid proteolytic agent contains insulin decomposing enzyme as an effective ingredient.

- USE/ADVANTAGE - The drug is used for prevention and treatment of Alzheimer's disease which is caused due to deposition of beta amyloid. The drug is effective for treatment of Alzheimer's disease by inhibiting accumulation of beta amyloid protein due to lack of beta amyloid decomposing system.

- In an example, rat insulin decomposing enzyme is prep'd. by purificn. of rat liver cytosol through 4-step chromatography, diethylaminoethyl-Toyopearl, hydroxyapatite, pentylagarose and TSK G3000SW high-performance liq. chromatography.

- Injection comprises 0.2 mg. rat liver insulin decomposing enzyme. 100 g, D-mannitol and distilled water (in total 2.0 ml.).(Dwg.0/2)

IW - BETA AMYLOID PROTEOLYTIC AGENT CONTAIN INSULIN DECOMPOSE ENZYME EFFECT INGREDIENT TREAT DISEASE

IKW - BETA AMYLOID PROTEOLYTIC AGENT CONTAIN INSULIN DECOMPOSE ENZYME EFFECT INGREDIENT TREAT DISEASE

NC - 001

OPD - 1994-02-28

ORD - 1995-09-12

PAW - (KYOW) KYOWA HAKKO KOGYO KK

TI - Beta amyloid proteolytic agent - contg. insulin decomposing enzyme as effective ingredient for treating Alzheimer's disease

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-238035

(43)公開日 平成7年(1995)9月12日

(51)Int.Cl.⁶
A 61 K 38/46

識別記号
ADD
AAM
AED

F I

技術表示箇所

A 61 K 37/54
ADD
AAM

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全4頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-30034

(22)出願日 平成6年(1994)2月28日

(71)出願人 000001029

協和醸酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 後藤 佐多良

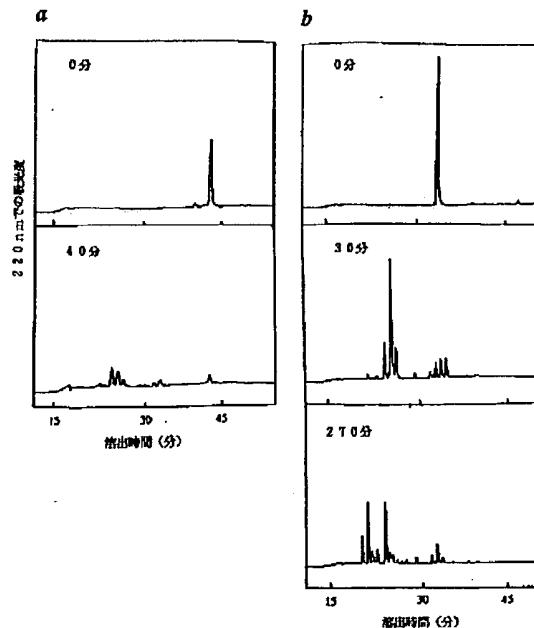
東京都千代田区四番町8-3

(54)【発明の名称】 β アミロイド蛋白質分解剤

(57)【要約】

【目的】 アルツハイマー病などの β アミロイド蛋白質(β A)の沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用な β A分解剤を提供する。

【構成】 インスリン分解酵素を有効成分とする β アミロイド蛋白質分解剤。



1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インスリン分解酵素を有効成分とする β アミロイド蛋白質分解剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アルツハイマー病などの β アミロイド蛋白質(以下、 β Aという)の沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用な β A分解剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 β Aは、アルツハイマー病などのある種の神経疾患患者の脳の神経細胞あるいは血管に沈着し痴呆などの症状を引き起こす原因物質とされている。 β Aは、膜貫通前駆体蛋白質(β APP)に由来する39~43アミノ酸からなり、 β APPの細胞質での正常な代謝過程で生じると言われている。アルツハイマー病患者の脳における β Aの蓄積は β A分解系の欠陥に起因すると考えられる。従って、 β A分解に関与する物質はアルツハイマー病などの β Aの沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用であると考えられる。従来、 β Aを除去する方法あるいは β Aの蓄積を防止する方法は知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、アルツハイマー病などの β Aの沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用な β A分解剤を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、インスリン分解酵素を有効成分とする β A分解剤に関する。インスリン分解酵素は、例えば国際酵素委員会分類番号EC3.4.2.2.11で表される酵素であり、ラット肝臓、ヒト赤血球、ヒト胎盤などから精製するかあるいは該当cDNA[Science, 242, 1415(1988)]を微生物、植物細胞あるいは動物細胞で発現させた後単離精製することにより得られる。

【0005】 ヒト赤血球インスリン分解酵素は、Science, 242, 1415(1988)に記載の方法により、ヒト胎盤インスリン分解酵素は、Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 1398(1991)に記載の方法により得ることができる。また、ラット肝臓インスリン分解酵素は、後述する試験例1に記載の方法により得ることができる。また、cDNAを発現させる方法としては、例えば、あらかじめ末端に数残基のヒスチジンをコードする塩基配列をつないだヒトイインスリン分解酵素cDNA[Science, 242, 1415(1988)]をカイコ核多角体病ウイルス(BmNPV)のポリヘドリン遺伝子のプロモーターを有するベクターpBK283につなぎ、BmNPV DNAと共にカイコ細胞(BmN4)に共感染させる。感染細胞の中から相同組換えを起こした組換え体ウイルスをクローニング

し、これをカイコガ幼虫に感染させヒトイインスリン分解酵素を産生させる。これを亜鉛アフィニティカラムクロマトグラフィーに付し、ヒトイインスリン分解酵素を精製する。

【0006】 次に、インスリン分解酵素の薬理作用について試験例で説明する。

試験例1 β A分解作用

ラット肝臓の細胞質分画を4段階のクロマトグラフィー

【ジエチルアミノエチルートヨバル (登録商標、東ソ
10 一社)、ヒドロキシルアバタイト、ベンチルアガロース、TSK G3000SW高速液体クロマトグラフィー(東ソ
ー社)】に付すことによりインスリン分解酵素を精製した。この精製酵素0.2 μ gおよび β A₁₋₄₀(Bachem California社)5 μ gあるいは β A₁₋₂₈(β A₁₋₄₀の1~28残基に相当、Bachem California社)11 μ gを、50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.0)70 μ l中37°Cでインキュベートした。経時にサンプルを採取し、これに0.06%トリフルオロ酢酸水溶液0.20
7mIを加え反応を停止した。反応液をRP-318逆相カラムクロマトグラフィー(Bio-Rad社;粒径5 μ m、250×4.6mm;0~80%アセトニトリル-0.06%トリフルオロ酢酸水溶液直線濃度勾配;流速0.5ml/分)に付し、溶出液の220nmでの吸光度を測定した。その結果を第1図に示す。

【0007】

【図1】 第1図から明らかなように、インスリン分解酵素は β Aをほぼ完全に小断片に分解した。

【0008】 試験例2 インスリン分解酵素-¹²⁵I- β A架橋試験
30 組織ホモジネートを遠心分離(100,000×g、60分)して得られたラット脳あるいはラット肝臓の細胞質分画50 μ gおよび¹²⁵I- β A₁₋₂₈[β A₁₋₂₈を、Na¹²⁵I(Amersham社)を用いクロラミント法[Biochem.J., 164, 607(1977)]によりラベル化し、逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製]を、2mM 1,10-フェナンスロリンおよび5mM-エチレンジアミン四酢酸存在下、150mM 塩化ナトリウム含有20mM リン酸緩衝液(pH7.4)中(計50 μ l)、24°Cでインキュベートした。10分後、架橋剤ジサクシニミルスペレート(1mM/2.5%ジメチルスルホキシド)3 μ lを加え、さらに15分間同温度で反応させ、これに5%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)および2.5%2-メルカプトエタノールを含有する緩衝液14 μ lを加え、反応を停止した。100°Cで3分間加熱後、生成物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、乾燥後、イメージングプレートに露光しBAS2000(富士フィルム社)で解析した。その結果を第2図に示す。

50 【0009】

3

【図2】第2図から明らかなように、 $^{125}\text{I}-\beta\text{A}_{1-28}$ は分子量110,000の蛋白質と特異的に結合した（lane 1, 脳；lane 5, 肝臓）。さらに、分子量110,000の蛋白質との架橋反応は過剰量の非標識 βA_{1-28} の添加により阻害され（lane 2）、また非標識 βA_{1-40} （lane 3）あるいはインスリン（lane 4）の添加によっても阻害された。

【0010】以上的事実は、細胞内蛋白質分解酵素の中で βA 分解作用を有するものがインスリン分解酵素のみであることを示す。インスリン分解酵素は、そのままあるいは各種の製薬形態で使用することができる。本発明の製薬組成物は、活性成分として、有効な量のインスリン分解酵素を薬理的に許容される担体と均一に混合して製造できる。これらの製薬組成物は、注射による投与に対して適する単位服用形態にあることが望ましい。

【0011】注射剤は、蒸留水、塩溶液、グルコース溶液または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製することができる。この際、常法に従い、適当な溶解補助剤または懸濁剤を用いて、溶液、懸濁液または分散液として調製される。また、当該液剤を凍結乾燥し、凍結乾燥剤として調製することもできる。凍結乾燥の条件は特に限定しないが、通常は、-50°C以下で1~5時間凍結し、棚温-20~0°C、真空度50~1

50 mTorrで24~48時間乾燥し、次いで棚温1*

処方	ヒト赤血球インスリン分解酵素
	D-マンニトール
	注射用蒸留水

* 0~30°C、真空度50~100 mTorrで16~24時間乾燥し、凍結乾燥品を得る。

【0012】なお、本発明の βA 分解剤は、通常の各種製薬担体、賦形剤、希釈剤、安定化剤あるいは吸着防止剤などを含むことができる。インスリン分解酵素は、上記製薬形態で注射剤として投与することができ、その有効容量および投与回数は、投与形態、患者の年齢、体重、症状などにより異なるが、通常成人一人当たり1.5 μg ~15 mg、好ましくは1.5 μg ~5 mgを1週間当たり1~7回投与する。投与方法としては、静脈注射、皮下注射、筋肉内注射、脳内投与などが用いられる。

【0013】以下に、実施例を示す。

【0014】

【実施例】

実施例1 注射剤

常法により次の組成からなる注射剤を作成する。ヒト赤血球から精製したインスリン分解酵素 [Science, 242, 1415(1988)] 0.125 mg/m1を注射用蒸留水80 m1に溶解し、これにD-マンニトール5.0 gを加え、注射用蒸留水で容量を100 m1にあわせる。得られた溶液を0.22 μm のディスボーザブル製メンブランフィルターを用いて無菌濾過後、ガラスバイアルに2 m1ずつ無菌的に充填し、注射剤（1バイアルあたり活性成分0.2 mgを含有する）を得る。

【0015】

0.2 mg
100 mg
適量
2.0 m1

30※1にあわせる。得られた溶液を0.22 μm のディスボーザブル製メンブランフィルターを用いて無菌濾過後、ガラスバイアルに2 m1ずつ無菌的に充填し、注射剤（1バイアルあたり活性成分0.2 mgを含有する）を得る。

【0017】

0.2 mg
100 mg
適量
2.0 m1

40★0.22 μm のディスボーザブル製メンブランフィルターを用いて無菌濾過後、ガラスバイアルに2 m1ずつ無菌的に充填し、注射剤（1バイアルあたり活性成分0.2 mgを含有する）を得る。

【0019】

0.2 mg
100 mg
適量
2.0 m1

【0016】実施例2 注射剤

常法により次の組成からなる注射剤を作成する。ヒト胎盤から精製したインスリン分解酵素 [Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 1398(1991)] 0.125 mg/m1を注射用蒸留水80 m1に溶解し、これにD-マンニトール5.0 gを加え、注射用蒸留水で容量を100 m1にあわせる。

処方	ヒト胎盤インスリン分解酵素
	D-マンニトール
	注射用蒸留水

0.2 mg
100 mg
適量
2.0 m1

【0018】実施例3 注射剤

常法により次の組成からなる注射剤を作成する。ラット肝臓から精製したインスリン分解酵素（試験例1参照）0.125 mg/m1を注射用蒸留水80 m1に溶解し、これにD-マンニトール5.0 gを加え、注射用蒸留水で容量を100 m1にあわせる。得られた溶液を★

処方	ラット肝臓インスリン分解酵素
	D-マンニトール
	注射用蒸留水

0.2 mg
100 mg
適量
2.0 m1

【0020】実施例4 注射剤

50 常法により次の組成からなる注射剤を作成する。ラット

5

肝臓から精製したインスリン分解酵素（試験例1参照）
0.625 mg/ml を注射用蒸留水 8.0 ml に溶解し、これにD-マンニトール 5.0 g を加え、注射用蒸留水で容量を 10.0 ml にあわせる。得られた溶液を
0.22 μm のディスボーザブル製メンブランフィルタ*

*一を用いて無菌濾過後、ガラスパイアルに 2 ml ずつ無菌的に充填し、注射剤（1パイアルあたり活性成分 1.0 mg を含有する）を得る。

【0021】

処方 ラット肝臓インスリン分解酵素	1.0 mg
D-マンニトール	100 mg
注射用蒸留水	適量

2.0 ml

10 a : βA_{1-40} を使用したときの結果b : βA_{1-28} を使用したときの結果

1 : ラット脳細胞質分画を使用したときの結果

2 : ラット脳細胞質分画を使用し、過剰量の非標識 βA_{1-28} を添加したときの結果3 : ラット脳細胞質分画を使用し、非標識 βA_{1-40} を添加したときの結果

4 : ラット脳細胞質分画を使用し、インスリンを添加したときの結果

5 : ラット肝臓細胞質分画を使用したときの結果

【0022】

【発明の効果】本発明により、アルツハイマー病などの βA の沈着によって引き起こされる疾患の治療および予防に有用な βA 分解剤が提供される。

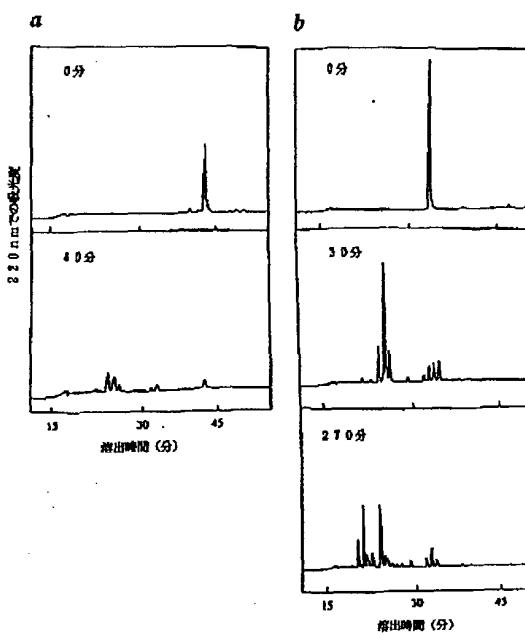
【図面の簡単な説明】

【図1】インスリン分解酵素による βA 分解の経時変化を追った高速液体クロマトグラムである。

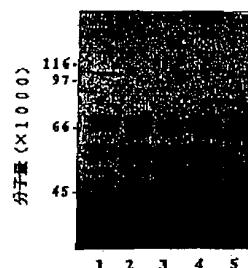
【図2】インスリン分解酵素- $^{125}I-\beta A$ 架橋試験の結果を電気泳動で解析した図である。

【符号の説明】

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号 市内整理番号

F I

技術表示箇所

A 61 K 37/54

AED